

STCM 2021
VIVRE OU MOURIR : QUELLE FIN CHOISIR ?



JEUDI 23 SEPTEMBRE 2021
Webinaire

9h20	Ouverture du congrès Saadia Kerdine-Römer, Présidente de la STCM
SESSION 1	LES DIFFERENTES MORTS CELLULAIRES EN TOXICOLOGIE Modérateur : Karine Andréau
9h30-10h00	Jean-Luc Perfettini Cannibalisme cellulaire, entose et plus encore...
10h00-10h30	Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel Nécroptose ; Mécanismes moléculaires de protection ?
10h30-11h20	SESSION JEUNES CHERCHEURS
Yasmin Arezki	Cationic carbon nanoparticles induce pyroptosis in macrophages <i>via</i> lysosomal dysfunction: Effect of nanoparticle surface charge titrability
Zakaria Baka	Elaboration d'un modèle de cancer ovarien sur puce par des approches combinées de bio-impression 3D et de microfluidique pour des applications en nano-médecine
Noémie Bonneau	Neuronal cell death mechanisms in a Toxicity-Induced Dry Eye (TIDE) model using Benzalkonium Chloride in CX3CR1-KO mice
Sophie Fouyet	Perturbateurs endocriniens et grossesse : rôle du récepteur de mort et de dégénérescence P2X7 dans les désordres placentaires
Ophélie Germande	Cytotoxicité et impact des NPs d'oxyde de nickel émises par les activités minières en Nouvelle Calédonie sur l'apoptose, dans des cellules endothéliales pulmonaires humaines et des hépatocytes d'anguille
Hélène Le Mentec	Développement d'essais biologiques utilisant le modèle de larve de poisson-zèbre pour cribler de potentiels perturbateurs endocriniens impliqués dans l'initiation et la progression pathologique des maladies non alcooliques du foie
Romain Magny	Lipidomic analysis of <i>in vitro</i> model of dry eye using molecular network: on the road to identify new markers of ocular surface damage in conjunctival imprints
Kelly Poitou	Étude des effets <i>in vitro</i> de plastifiants entrant dans la composition des gants à usage professionnel sur un modèle de cellules endothéliales microvasculaires
Hélène Rogue	Effets de l'exposition à l'éthylbenzène d'un modèle <i>in vitro</i> d'épithélium alvéolaire humain
Rima Souki	Analysis of miRNAs as novel molecular targets and biomarkers of cell death induced by benzo[<i>a</i>]pyrene in human peripheral blood mononuclear cells

SESSION 2 MOURIR EN TOXICOLOGIE : QUELLES MESURES ?

Modérateur : Sylvain Billet

11h30-12h

Déborah Lecuyer

De la cytométrie en flux à l'imagerie multispectrale pour la détection simultanée des décès autonomes et non autonomes des cellules

12h-12h30

Bernard Fromenty

Paracétamol et foie gras : une combinaison dangereuse

12h30-13h

Normand Podechard

La co-exposition alcool/hydrocarbure induit la progression de la stéatose vers la NASH : le poisson-zèbre comme nouveau modèle d'étude

13h-13h30

Sylvie Chollet-Martin

Nétose et inflammation

Pause déjeuner**SESSION 3 MORT CELLULAIRE & INFLAMMATION**

modérateur : Saadia Kerdine-Römer

14h30-15h

Mathias Faure

L'autophagie garante de l'immunité et de l'inflammation

15h-15h30

François Huaux

Diversité des signaux de danger libérés après membranolyse des macrophages exposés aux particules toxiques

15h30-16h**Présentation de la STCM**

Saadia Kerdine-Römer et Sylvain Billet

16h**Clôture du congrès**

Pour plus d'informations sur les activités de la Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire, rendez-vous sur :

<https://stcm-france.fr>

Résumés des présentations de la session « jeunes chercheurs »

Cationic carbon nanoparticles induce pyroptosis in macrophages *via* lysosomal dysfunction: Effect of nanoparticle surface charge titrability

Yasmin Arezki, Mickaël Rapp, Luc Lebeau, Françoise Pons, et Carole Ronzani

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

y.arezki@unistra.fr

This study aimed at studying the role of the charge in the toxicity of carbon nanoparticles (NP) called carbon dots (CDs), using cationic CDs exhibiting titratable or non-titratable amino groups at their surface. Two titratable and two non-titratable CDs were synthesized from a mixture of citric acid and bPEI25k or PEI600 (two different sources of amino groups) and their cellular effects were compared in human macrophages. The two CDs with titratable charges were more internalized by cells and induced greater viability loss than their non-titratable counterpart. A cell necrosis, an increased IL-1 β secretion and an activation of caspase-1 were also observed in response to the four NPs, with greater responses with the two titratable CDs. Inhibition of caspase-1 decreased CD-induced necrosis and IL-1 β secretion, while restoring cell viability. Besides, we showed that: 1-cationic CDs localized in lysosomes after their cell entry, resulting in swelling and loss of integrity of this organelle, and 2-inhibition of the lysosomal enzyme cathepsin B, decreased IL-1 β secretion. Thus, our data showed that cationic CDs induce pyroptosis in macrophages *via* lysosomal dysfunction, and that these effects are linked to the cationic charges present at the surface of the NPs

Elaboration d'un modèle de cancer ovarien sur puce par des approches combinées de bio-impression 3D et de microfluidique pour des applications en nano-médecine.

Zakaria Baka¹, Olivier Joubert¹ et Halima Alem^{1,2}

¹ Université de Lorraine, CNRS, IJL, F-54000 Nancy, France.

² Institut Universitaire de France

bakazakariapharmacie@gmail.com

Les cultures cellulaires en deux dimensions sont incapables de reproduire la complexité tissulaire. Les modèles microfluidiques et la bio-impression 3D permettent de mieux simuler les aspects dynamiques, et l'architecture cellulaire caractérisant les tissus vivants. La combinaison de ces deux technologies permettrait d'élaborer des modèles plus représentatifs des tissus humains et donc plus prédictifs de leurs réponses aux xénobiotiques.

Le projet consiste en la bio-impression 3D d'un modèle de tumeur ovarienne qui sera introduite dans un dispositif microfluidique afin de le soumettre à un flux physiologique. Pour la bio-impression, une bio-encre (gélatine et alginate de sodium) a été optimisée pour assurer une bonne imprimabilité à 37°C. Ensuite, des tissus tumoraux comprenant des cellules cancéreuses ovariennes SKOV3 ont été imprimés et la viabilité mesurée. D'autre part, un dispositif microfluidique a été conçu et des prototypes en polydiméthylsiloxane ont été fabriqués par une méthode de moulage. Une fois totalement caractérisé, ce modèle servira de support pour tester des nanoparticules thérapeutiques.

Neuronal cell death mechanisms in a Toxicity-Induced Dry Eye (TIDE) model using Benzalkonium Chloride in CX3CR1-KO mice

Noémie Bonneau^{1,2,*}, Christophe Baudouin^{1,2,3}, Stéphane Melik-Parsadaniantz¹, Annabelle Réaux-Le Goazigo¹ et Françoise Brignole-Baudouin^{1,3,5}

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, IHU FOReSight, Institut de la Vision, 75012 Paris, France

²Horus Pharma, 06700 Saint-Laurent-du-Var, France

³Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DGOS CIC 1423, IHU FOReSight, 75012, France

⁴Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Hôpital Ambroise Paré, APHP, F-92100 Boulogne-Billancourt, France

⁵Université de Paris, Faculté de Pharmacie de Paris, 75006 Paris, France

noemie.bonneau@inserm.fr

Toxicity-Induced Dry Eye (TIDE) can occur after chronic exposure to low doses of toxic compounds, especially to benzalkonium chloride (BAC), a quaternary ammonium used at low concentrations in antiglaucoma eyedrops. This xenobiotic alters at the same time corneal epithelium but also its innervation, emerging from the trigeminal ganglion (TG) of the 5th cranial nerve. Oxidative stress and inflammation are among the first events occurring in TIDE but downstream molecular mechanisms leading to neuronal cell death are not precisely known. Here, we measured the expression of cell death-related genes (apoptosis: caspase-3, ferroptosis: GPX4; pyroptosis GSDM; necroptosis: MLKL, RIPK3) in a primary trigeminal cell culture exposed to 5.10⁻⁴ % BAC (2 and 6 hours) from wild-type or CX3CR1^{-/-} mice. CX3CR1 is the receptor of fractalkine, a chemokine found in tears of patients suffering from dry eye. Our results showed that BAC upregulated ferroptosis, pyroptosis, necroptosis and apoptosis genes at different stages depending on the kinetic. The absence of CX3CR1 prevented the induction of ferroptosis (GPX4) and pyroptosis (GSDM) genes. Understanding the role of these various cell-death mechanisms and the implication of CX3CR1 will enable to precise TIDE adverse outcome pathways and consider new therapeutic targets.

Perturbateurs endocriniens et grossesse : rôle du récepteur de mort et de dégénérescence P2X7 dans les désordres placentaires

Sophie Fouyet^{1,2}, Elodie Olivier¹, Pascale Leproux¹, Mélody Dutot^{1,3} et Patrice Rat¹

¹UMR CNRS 8038, Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, Université de Paris, Faculté de Pharmacie de Paris, 75006 Paris, France

²Laboratoire Léa Nature, Périgny, France

³Recherche & Développement, Yslab, 29000 Quimper, France

sophie.fouyet@etu.u-paris.fr patrice.rat@u-paris.fr

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont omniprésents dans notre environnement et impactent particulièrement les femmes enceintes et leur fœtus. Etant retrouvés dans de nombreux tissus maternels durant la grossesse, les PE pourraient être responsables de prééclampsies et de naissances prématurées. Le placenta, organe transitoire aux fonctions endocrines majeures, concentre les PE, aggravant ainsi leurs effets délétères sur la mère et le fœtus. Les mécanismes cellulaires de ces effets délétères restent encore peu connus. Néanmoins, il a été suggéré que les accouchements prématurés et les prééclampsies pouvaient être déclenchés par l'activation des récepteurs de mort et de dégénérescence P2X7. L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'implication des récepteurs P2X7 dans les dégénérescences placentaires induites par des PE de familles chimiques différentes. Nous avons observé que le diéthylstilbestrol, le triclosan, le benzylbutylphtalate et le DEHP activent tous les récepteurs de mort P2X7 et la voie de l'apoptose caspase-9-dépendante dans les cellules de placenta humain. L'apoptose observée est inhibée lorsqu'un antagoniste des récepteurs P2X7 est utilisé. Ainsi, l'activation des récepteurs P2X7, déclenchant l'apoptose intrinsèque, pourrait être un événement clé dans l'apparition des désordres placentaires induits par les PE.

Cytotoxicité et impact des NPs d'oxyde de nickel émises par les activités minières en Nouvelle Calédonie sur l'apoptose, dans des cellules endothéliales pulmonaires humaines et des hépatocytes d'anguille

Ophélie Germande^{1,2,3}, Isabelle Baudrimont^{1,2,*} et Magalie Baudrimont^{1,3*}

¹Univ. Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France

²Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, avenue du Haut Lèveque, Pessac F-33604, France.

³UMR EPOC 5805, Université de Bordeaux-CNRS, Place du Dr Peyneau, F-33120, Arcachon, France

* co-derniers auteurs

ophelie.germande@u-bordeaux.fr

Les activités minières en Nouvelle-Calédonie amplifient l'érosion naturelle des sols conduisant à l'émission atmosphérique de nanoparticules d'oxyde de nickel (NiONPs). Ces particules se retrouvent dans les écosystèmes aquatiques, et pénètrent, après inhalation, dans les voies respiratoires et le système cardiovasculaire des travailleurs et de la population environnante. Malgré des concentrations alarmantes de nickel dans les eaux douces et dans l'atmosphère, peu d'étude expliquent les mécanismes induits par des NiONPs sur des cellules d'organismes aquatiques vivant sous influence minière en particulier les anguilles sensibles à la contamination de l'eau par les métaux, et, sur des cellules cibles endothéliales pulmonaires (HPAEC). L'objectif de cette étude est d'évaluer, *in vitro*, sur des hépatocytes d'anguilles (HEPA-E1) et des HPAEC, la cytotoxicité et les effets des NiONPs sur la mort cellulaire. Les cellules sont exposées 24h avec les NiONPs (0.5-150 µg/cm²). Différents paramètres sont étudiés (i) la viabilité cellulaire, (ii) l'activité de la caspase 9 et (iii) la transcription de gènes de l'apoptose. Dans les deux types cellulaires, les NiONPs induisent une diminution de la viabilité cellulaire et une activation de l'apoptose. Ces résultats soulignent l'impact toxique potentiel des NiONPs sur les anguilles vivant sous influence minières et sur les travailleurs et population de proximité

Développement d'essais biologiques utilisant le modèle de larve de poisson-zèbre pour cribler de potentiels perturbateurs endocriniens impliqués dans l'initiation et la progression pathologique des maladies non alcooliques du foie

Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monniez, Antoine Legrand, Maëlle Bescher, Dominique Lagadic-Gossmann et Normand Podechard

Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, Rennes, France

helene.le-mentec@univ-rennes1.fr

Les maladies non alcooliques du foie (NAFLD) représentent un problème majeur de santé publique, touchant 25% de la population mondiale et jusqu'à 80% des personnes atteintes d'obésité. Les NAFLD débutent par une stéatose, un état bénin caractérisé par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes et peuvent évoluer vers un état pathologique, la stéatohépatite, propice aux cirrhoses et cancers. De nombreuses données suggèrent que l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE), contaminants auxquels l'homme est continuellement exposé, agirait sur les NAFLD. Afin d'évaluer leurs effets sur ces maladies, nous développons deux tests biologiques, chez la larve de poisson-zèbre, permettant d'étudier l'impact de 10 PE dans l'apparition et la progression des NAFLD.

Le premier test (StAZ) évalue la capacité des PE à induire une stéatose, par quantification des lipides hépatiques, et nous permet de confirmer l'effet stéatogène de certaines molécules (phtalates, insecticides). Le second test (ShAZ) a pour but d'identifier les PE capables de favoriser le développement d'une stéatohépatite en suivant des marqueurs caractéristiques de cette pathologie : mort cellulaire, stress oxydant, inflammation. Dans l'ensemble, ces études devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des PE pour *in fine* aider les agences de santé publique à la prise de décision quant à leur réglementation.

Lipidomic analysis of *in vitro* model of dry eye using molecular network: on the road to identify new markers of ocular surface damage in conjunctival imprints

Romain Magny^{1,2}, Karima Kessal^{1,3}, Anne Regazzetti², Stéphane Melik-Parsadaniantz¹, Christophe Baudouin^{1,3,4}, Olivier Laprèvote^{2,5}, Nicolas Auzeil² et Françoise Brignole-Baudouin^{1,2,3}

¹ Sorbonne Université UMR80, INSERM UMR 968, CNRS UMR 7210, Institut de la Vision, IHU FOReSight, Paris, France.

² Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire CNRS UMR 8038, Université de Paris, Faculté de Pharmacie, Paris, France.

³ Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, Paris 75012, France.

⁴ Hôpital Ambroise Paré, APHP, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Boulogne-Billancourt 92100, France.

⁵ Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Service de Biochimie, 75015, Paris, France.

romain.magny@inserm.fr

Dry eye disease (DED) is a multifactorial chronic inflammatory pathology of the ocular surface characterized by tear film instability, cell damage, inflammation and hyperosmolarity (HO). While lipid species have key roles in inflammatory and cell death processes, only few studies were dedicated to investigating these metabolites. The purpose of this study was to assess lipid homeostasis changes in a well-established *in vitro* model of DED *i.e.* human corneal epithelial (HCE) cells incubated in HO. In addition, comparison with the lipidome of human conjunctival imprints (CI) was performed in perspective of a translational study to a cohort of DED patients. Untargeted lipidomic analysis was performed using liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry. HO induced lipid homeostasis disruption with an increase in ceramide species and triglycerides, two lipid subclasses involved in inflammatory and cell death pathways. Furthermore, relative distribution of lipid classes is similar in CI and HCE including 80% phospholipids, 12% sphingolipids, 5% glycerolipids and 3% fatty acids. Our results highlight lipid alterations related to inflammatory and cell death processes in an *in vitro* model of DED. Results obtained from *in vitro* models need to be confirmed in CI of DED patients to identify new markers of OS damage.

Étude des effets *in vitro* de plastifiants entrant dans la composition des gants à usage professionnel sur un modèle de cellules endothéliales microvasculaires

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Christelle Monteil, Cécile Corbière

Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, UR ABTE, 76000 Rouen, France

kelly.poitou1@univ-rouen.fr

L'exposition aux plastifiants soulève des inquiétudes au regard des études qui ont rapporté leurs effets délétères sur la santé humaine, notamment sur les systèmes reproducteur et cardiovasculaire. Cependant, leurs effets vasculaires restent peu étudiés. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux gants comme source d'exposition en se focalisant sur trois plastifiants (DEHP, DEHT et DINP) qui ont été quantifiés dans les gants après une étude analytique (GC-MS et HPLC-DAD). Leurs effets ont été évalués *in vitro* sur un modèle de cellules endothéliales microvasculaires (HMEC-1). À la suite des expositions cellulaires aux plastifiants avec les molécules seules (15 mg/l) et en mélange, les effets des plastifiants ont été évalués en mesurant la viabilité cellulaire par le test MTT et en dosant l'ATP et l'ADP par HPLC-DAD. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la viabilité cellulaire dès 24h d'exposition, sauf pour le DEHT. Une diminution de la viabilité cellulaire est observée de manière temps-dépendant pour toutes les molécules après 24h d'exposition. Des modifications du ratio ATP/ADP pour le DEHP et le mélange ont été observées dès 3h d'exposition. Les données pour les temps d'exposition plus longs sont en cours d'analyse.

Effets de l'exposition à l'éthylbenzène d'un modèle *in vitro* d'épithélium alvéolaire humain

Hélène Rogue, Nour Jaber et Sylvain Billet

Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4492 - UCEIV - Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Dunkerque, France

hrogue@etud.univ-angers.fr

L'éthylbenzène est un composé organique volatil (COV) de la famille des BTEX (Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylène) présents dans les carburants, les environnements industriels et domestiques. L'objectif de ce projet était d'évaluer sa toxicité *in vitro répétée* dans un modèle pulmonaire humain exposé à des concentrations réalistes.

Après une recherche bibliographique des marqueurs pertinents du métabolisme et de la toxicité de l'éthylbenzène, des cellules issues de la lignée A549 ont étéensemencées dans des inserts et cultivées en interface air/liquide. Les cellules ont été exposées à de l'éthylbenzène à 20 et 100 ppm, pendant une heure par jour pendant un à trois jours. Ces concentrations d'exposition ont été choisies car elles correspondent aux valeurs limites d'exposition professionnelles réglementaires (VLEP et VLCT, Valeur Limite à Court Terme).

Les cellules et leurs milieux de culture ont été récupérés pour l'étude des différents marqueurs sélectionnés. Tout d'abord, Le dosage spectrophotométrique de l'activité extracellulaire de la LDH n'a pas montré d'altération de la viabilité cellulaire. Les ARN ont ainsi pu être ensuite extraits et dosés avant quantification par RT-qPCR pour étudier des marqueurs caractéristiques des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (CYP1A1, CYP2E1, GSTM1) de cytotoxicité (Bax, Bcl2), et d'inflammation (IL-6). En complément, un dosage ELISA a également permis d'analyser les teneurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et GM-CSF) sécrétées dans le milieu de culture. A la dose d'exposition correspondant à la VLCT, l'expression génique des CYP1A1 et CYP2E1 a été significativement augmentée, en particulier lors des expositions répétées d'une heure par jour pendant trois jours. En revanche, les expositions à l'éthylbenzène n'ont pas entraîné de variations significatives des marqueurs de l'inflammation, que ce soit au niveau génique ou protéique. Le rapport Bax/Bcl-2 tendrait à montrer l'activation de mécanismes anti-apoptotiques. Nos résultats tendent à montrer l'activation de mécanismes d'action impliqués dans la toxicité de l'éthylbenzène en cas d'expositions répétées à la VLCT.

Analysis of miRNAs as novel molecular targets and biomarkers of cell death induced by benzo[a]pyrene in human peripheral blood mononuclear cells

Rima Souki, Jérémy Amossé, Dominique Lagadic, Eric le Ferrec et Lydie Sparfel

Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, Rennes, France

rima.souki@univ-rennes1.fr

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are major environmental pollutants known for their adverse toxic effect on human health. Among them, benzo[a]pyrene (B[a]P), a certain carcinogenic PAH, has shown immunotoxic effects in human. MicroRNAs are small non-coding RNA involved in post-transcriptional regulations; they have been extensively involved in several cellular processes and recently shown to be affected by environmental pollutants.

In the present study, we aim to characterize the effect of B[a]P in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and evaluate the miRNA response in these circulating immune cells. As revealed by the results from morphological studies, Hoechst/Sytox Green staining, and gene expression studies, B[a]P has been shown to induce apoptosis at 2 μ M for a 48h exposure on PBMC with dysregulated expression of several apoptosis-related miRNAs identified by high-throughput RNA sequencing. Overall, these data show that B[a]P is able to alter miRNome of human circulating blood cells and identify some of them as key regulators in cell death induced by such an exposure. For the future, we will be interested to know whether the miRNA identified would be transmitted by the extracellular vesicles secreted from B[a]P-exposed PBMC to adjacent cells, leading to the discovery of circulating biomarkers for pollutant exposure.